

# Pleiotropic effects of non-structural matrix proteins in the stressed heart : ECM remodeling in cardiotoxicity, aging and cardiac allograft rejection

Citation for published version (APA):

van Almen, G. C. (2012). *Pleiotropic effects of non-structural matrix proteins in the stressed heart : ECM remodeling in cardiotoxicity, aging and cardiac allograft rejection*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20120516ga>

## Document status and date:

Published: 01/01/2012

## DOI:

[10.26481/dis.20120516ga](https://doi.org/10.26481/dis.20120516ga)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 06 May. 2023

## Summary

Cardiovascular diseases form a major health issue and its socio-economic burden will continue to rise over the next decade. Despite the improved survival rate of heart failure (HF) patients the incidence is still increasing, illustrating the need for better prevention and treatment strategies. HF often occurs as the result of maladaptive remodeling of the cardiac tissue following the heart's attempt to maintain cardiac function after injury. This response involves a substantial rearrangement of the cellular and extracellular matrix (ECM) compartment of the myocardium, and is tightly regulated by the interplay between cardiac cells and their surrounding matrix. Increasing evidence suggests that non-structural matricellular proteins not only regulate structural integrity of the ECM meshwork, but also play an indispensable role in cell-matrix communication and thereby determine cell and tissue function. This thesis hypothesizes that matricellular proteins not only regulate ECM deposition and turnover but also regulate cardiomyocyte behavior in the healthy and diseased heart and thus significantly affect the outcome of myocardial remodeling; i.e. preserved cardiac function (adaptive) or HF (maladaptive). The studies described here, highlight the matricellular proteins thrombospondin-1 (TSP-1) and -2 (TSP-2), connective tissue growth factor (CTGF), the proteoglycan syndecan-1 (synd-1) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and extend the current knowledge on their role in the hypertensive and ischemic heart towards their function in cardiotoxicity, aging and cardiac allograft rejection.

Of the many matricellular proteins thrombospondins (TSPs) are highlighted as key modulators of angiogenesis, wound healing and tumor formation, but apart from enhanced expression associated with cardiac injury, little is known about their role in the heart. Chapter 2 elaborates on the function of TSPs in the heart, thereby focusing on their ability to interact with cytokines such as transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), the cell surface receptors CD36 and CD47/integrin associated protein (CD47/IAP), and matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs). Despite the analogy in protein structure and thus their ability to interact with the same ligands, in particular of TSP-1 and TSP-2, TSPs have distinct functions depending on their spatio-temporal expression and the nature of the remodeling process; i.e. TSP-1 is associated with regulation of the early inflammatory response, whereas TSP-2 is related to proliferation and ECM maturation during later stages of remodeling after myocardial infarction (MI).

The pleiotropic character of TSP-2 is illustrated in chapter 3, revealing both ECM and cardiomyocyte abnormalities that contribute to accelerated cardiac aging in TSP-2

knockout (TSP-2-KO) mice. Survival rate in the first 60 weeks of their lives was significantly lower in TSP-2-KO mice compared to wild-type (WT) littermates, as >55% of the TSP-2-deficient mice died within 24–60 weeks. Surviving TSP-2-KO mice had increased cardiac dilation and fibrosis in addition to enhanced cardiomyocyte stress related to impaired Akt-survival signaling. Importantly, re-expression of TSP-2 in the hearts of TSP-2-KO mice normalized their survival and prevented cardiac dilation. Interestingly, doxorubicin (DOX) induced cardiotoxicity, as described in chapter 4, recapitulates the cardiac aging phenotype in TSP-2-KO mice. Twelve weeks of chronic DOX treatment causes substantial ECM disruption and cardiomyocyte apoptosis in TSP-2-KO hearts. Increased cell death after DOX is associated with reduced Akt phosphorylation in cardiomyocytes, similar to the cell stress observed in cardiac aging. Moreover, the enhanced matrix disruption in DOX-treated TSP-2-KO mice went along with increased MMP-2 levels. Together these studies show that TSP-2 affects both the ECM and cardiomyocyte compartment and thereby illustrate its bifunctional role in the heart.

Matricellular proteins are constantly expressed at relatively low levels during normal post-natal life in order to maintain tissue homeostasis, however during cardiac injury their expression increases. This suggests that changes in intrinsic mechanisms that function to fine-tune transcription of these proteins might result in altered expression profiles that affect the balance between ECM deposition and breakdown. Chapter 5 describes such a mechanism, and demonstrates that aging-associated changes in the expression of microRNA (miR)-18a and miR-19a/b relate to altered expression profiles of the profibrotic matricellular proteins CTGF and TSP-1. Aging-induced HF in 104 weeks old mice was characterized by decreased miR-18a and miR-19a/b expression paralleled by enhanced CTGF and TSP-1 protein levels, whereas opposite expression patterns were observed in age-matched mice with a preserved cardiac function. Importantly, this mechanism seems to be restricted to cardiomyocytes, as overexpression or inhibition of miR-18a and miR-19b, respectively blunts or enhanced CTGF and TSP-1 protein levels, coinciding with reduced or increased collagen expression, whereas repression of these miRNAs in fibroblasts had no effect on CTGF or TSP-1. This study implies that upregulation of miR-18a and miR-19a/b in cardiomyocytes functions to dampen the fibrotic remodeling process that contributes to the functional decline with cardiac aging.

Altered expression of matricellular proteins, proteoglycans and the MMP-system not only determines the mechanical properties of the heart, but also modulates key inflammatory and reparative mechanisms in models of cardiac ischemia, aging and myocarditis. Chapter 6 elaborates on the role of these ECM molecules in the inflammatory response in the transplanted heart. From a selection of inflammation-related matricellular proteins, proteoglycans and MMPs/TIMPs, synd-1 and MMP-9 were identified to mark the degree of cardiac allograft rejection. Enhanced expression of both synd-1 and MMP-9 correlates with the inflammatory markers tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and

interleukin-6 (IL-6), and parallels the progressive increase in CD3<sup>+</sup> T-cells and CD68<sup>+</sup> monocytes. Altogether suggesting that alterations in the expression of synd-1 and MMP-9 contribute to the pathogenesis of cardiac allograft rejection.

The versatility of roles of matricellular proteins described in this thesis illustrates their pleiotropic nature and strengthens the idea of the ECM as a highly dynamic meshwork of structural and non-structural molecules interacting with the embedded cells. Moreover, the function of certain matricellular proteins highly depends on the cell type and nature of the pathological condition. Therefore ECM proteins shape and define the extracellular landscape at any time and thereby directly affect the behavior of the cells that reside within the heart. Understanding of the pleiotropic nature in relation to the spatio-temporal expression of matricellular proteins provides new avenues for exploring their therapeutic potential.



## Samenvatting

Hart- en vaatziekten vormen een grote bedreiging voor de volksgezondheid en naar verwachting zal de omvang van dit probleem het komende decennium verder toenemen. Ondanks een stijging van de overlevingskans bij patiënten met hartfalen (HF) neemt het aantal nieuwe patiënten nog steeds toe en hiermee ook de behoefte aan verbeterde preventie en behandelmethoden. HF ontwikkelt zich als gevolg van maladaptieve remodellering van het hartweefsel na een uiterste poging van het hart om zijn functie te behouden na beschadiging. Tijdens deze reactie vindt een uitgebreide reorganisatie van de cellulaire en extracellulaire matrix (ECM) compartimenten plaats, die nauw wordt gereguleerd door het samenspel tussen de hartspiercellen en de omliggende matrix. Een toenemend aantal bevindingen impliceert dat niet-structurele, matricellulaire eiwitten niet alleen betrokken zijn bij de regulatie van de structurele eigenschappen van de ECM, maar ook een uiterst belangrijke rol spelen bij de communicatie tussen cellen en de ECM en zodoende cel- en weefselfunctie beïnvloeden. De hypothese in dit proefschrift stelt dat matricellulaire eiwitten niet alleen afbraak en opbouw van de ECM controleren, maar ook het gedrag van cardiomyocyten in het gezonde en zieke hart en daarmee het resultaat van cardiale remodellering beïnvloeden; dat wil zeggen, behoud van functie (adaptief) of de ontwikkeling van hartfalen (maladaptief). De studies in dit proefschrift belichten de matricellulaire eiwitten thrombospondin-1 (TSP-1) en -2 (TSP-2), connective tissue growth factor (CTGF), de proteoglycaan syndecan-1 (synd-1) en matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) en behandelen hun rol in het hart na schade ten gevolge van cardiotoxiciteit, veroudering en na harttransplantatie.

Van de vele matricellulaire eiwitten worden thrombospondines (TSPs) gezien als belangrijke modulators van angiogenese, wondheling en tumorvorming. Naast een verhoogde expressie bij beschadiging van het myocard, is weinig bekend over de rol van TSPs in het hart. Hoofdstuk 2 beschrijft de mogelijke functies van TSPs in het hart als gevolg van hun interactie met cytokinen zoals transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), oppervlakte receptoren als CD36 en CD47/integrin associated protein (CD47/IAP) en matrix metalloproteinases (MMPs) en hun inhibitoren (TIMPs). Ondanks de analogie in eiwitstructuur en daarmee de mogelijkheid om dezelfde liganden te binden is de functie van met name TSP-1 en TSP-2 sterk afhankelijk van hun plaats- en tijdsgebonden expressie en de aard van het remodelleringsproces; met name TSP-1 wordt geassocieerd met regulatie van de acute ontstekingsfase terwijl TSP-2 betrokken is bij de regulatie van celproliferatie en organisatie van de ECM gedurende latere fasen van remodellering na een hartinfarct.

Het pleiotrope karakter van TSP-2 wordt verder beschreven in hoofdstuk 3 dat aan toont dat afwezigheid van TSP-2 in TSP-2 knockout (KO) muizen leidt tot veranderingen in de ECM structuur en cardiomyocytfunctie, die bijdragen aan de versnelde veroudering van de hartspier. Het aantal TSP-2-KO muizen dat de eerste 60 levensweken overleeft is ruim de helft lager dan in wildtype (WT) muizen, en mortaliteit treedt op vanaf een leeftijd van 24 weken. Overlevende TSP-2-KO muizen hebben een gedilateerd hart met de vorming van fibrose, naast verhoogde celschade als gevolg van verminderde Akt-survival signalering. Herstel van TSP-2 expressie in het hart van TSP-2-KO muizen voorkomt vroegtijdig overlijden en dilatatie van het myocard. Cardiotoxiciteit als gevolg van doxorubicine (DOX) behandeling, zoals beschreven in hoofdstuk 4, versnelt het fenotype van cardiale veroudering in TSP-2-KO muizen. Chronische behandeling voor 12 weken met DOX veroorzaakt een substantiële verstoring van de ECM organisatie en apoptose van cardiomyocyten in TSP-2-KO harten. Verhoogde celdood na DOX is gerelateerd aan verminderde Akt fosforylatie in cardiomyocyten, zoals reeds gezien in hartspiercellen tijdens veroudering. De sterk verminderde organisatie van de ECM in DOX behandelde TSP-2-KO muizen gaat gepaard met een verhoogde aanwezigheid van MMP-2. Deze studies tonen aan dat TSP-2 zowel de ECM als het cardiomyocyt compartiment beïnvloedt en bevestigen daarmee de bifunctionele rol van dit eiwit in het hart.

Expressie van matricellulaire eiwitten wordt gekenmerkt door de relatief lage aanwezigheid in gezond hartweefsel na de geboorte. Echter, tijdens beschadiging van de hartspier neemt de expressie toe. Dit suggereert dat kleine veranderingen binnen het mechanisme dat de transcriptie van deze eiwitten reguleert kan leiden tot een verschuiving van de balans tussen ECM opbouw en afbraak. Hoofdstuk 5 beschrijft hoe veranderingen in expressie van microRNA (miR)-18a en miR-19a/b tijdens veroudering gerelateerd zijn aan het expressie patroon van de profibrotische matricellulaire eiwitten CTGF en TSP-1. Muizen van 104 weken oud met HF worden gekenmerkt door een afname van miR-18a en miR-19a/b expressie tezamen met een toename van CTGF en TSP-1. Een omgekeerd expressie patroon is gevonden in muizen van dezelfde leeftijd waarbij de functie van het hart behouden was. Verhoogde inductie of remming van miR-18a en miR-19b in cardiomyocyten leidt tot een afname, respectievelijk toename in CTGF en TSP-1 expressie parallel met een verlaagde en verhoogde transcriptie van collagenen. Repressie van deze miRNAs in fibroblasten heeft echter geen effect op de expressie van CTGF en TSP-1, wat suggereert dat dit mechanisme specifiek is voor de cardiomyocyt. Deze studie impliceert dat miR-18a en miR-19b expressie wordt geïnduceerd in cardiomyocyten om het fibrotische remodeleringsproces in het hart te remmen en daarmee een vermindering van de hartfunctie tijdens veroudering te voorkomen.

Verandering in de expressie van matricellulaire eiwitten, proteoglycanen en het MMP-systeem beïnvloeden niet alleen de mechanische eigenschappen van het hart, maar spelen ook een belangrijke rol tijdens inflammatie in modellen van cardiale ischemie,

veroudering en myocarditis. In hoofdstuk 6 wordt de rol van deze ECM moleculen besproken tijdens de inflammatoire reactie in het hart na transplantatie. Uit een screening van inflammatie-gerelateerde matricellulaire eiwitten, proteoglycanen en MMPs/TIMPs is naar voren gekomen dat het expressie patroon van synd-1 en MMP-9 representatief is voor de mate van afstoting van het getransplanteerde hart. Verhoogde expressie van synd-1 en MMP-9 correleert met een toename van de inflammatoire cytokinen tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en interleukin-6 (IL-6) en met de aanwezigheid van T-cellen en monocysten. Deze bevindingen tonen aan dat verhoogde expressie van synd-1 en MMP-9 mogelijk een integrale rol speelt bij de pathogenese tijdens afstoting van het getransplanteerde hart.

De variëteit aan functies die beschreven worden in dit proefschrift illustreren het pleiotrope karakter van matricellulaire eiwitten en versterken de hypothese dat de ECM een complex netwerk vormt van structurele en niet-structurele eiwitten dat nauw communiceert met de cellen in het weefsel. Daarnaast wordt de functie van veel matricellulaire eiwitten bepaald door het celtype en de aard van de pathologische conditie. Het palet van aanwezige matricellulaire eiwitten is dus bepalend voor de eigenschappen van het extracellulaire landschap en beïnvloedt hiermee direct het gedrag van de aanwezige cellen in het hart. Begrip en herkenning van het pleiotrope karakter van matricellulaire eiwitten in relatie tot hun plaats- en tijdsgebonden expressie dragen bij aan de ontdekking van nieuwe therapeutische mogelijkheden van deze moleculen.